

# 多能性幹細胞の未分化・分化を制御するシグナル調節因子の解析

## Analysis of signal-regulatory factors that control undifferentiated state and differentiated state of pluripotent stem cells

13D5606 三浦 太一

指導教授名 西原 祥子

### SYNOPSIS

“Naïve” mouse embryonic stem cells (mESCs) are derived from pre-implantation embryos and possess pluripotency, the ability to differentiate into every cell type of the body. “Primed” mouse epiblast stem cells (EpiSCs) are also pluripotent stem cells but are derived from post-implantation embryos. ESC-derived EpiSCs (ESD-EpiSCs) are “primed” pluripotent stem cells and can be reverted to naïve mESCs under appropriate culture conditions. In naïve mESCs, the maintenance of undifferentiated state and the induction of differentiation are regulated by several signaling pathways such as LIF, BMP4, Wnt and FGF4 signaling pathways. These signaling components are regulated by posttranslational modification including phosphorylation, ubiquitination and *O*-GlcNAcylation, *O*-linked  $\beta$ -*N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) modification on cytosolic and nuclear proteins. However, the functions of *O*-GlcNAc in primed ESD-EpiSCs and in the reversion from primed to naïve states remain unclear. Furthermore, recently, it has been reported that the reactive species regulate the several signaling pathways. However, the effects of the reactive species on the signaling pathways contributing to the differentiation from mESCs have not been clarified yet. In this thesis the following functions of signal-regulatory factors are newly elucidated; 1) *O*-GlcNAcylation plays an important role in the survival of primed ESD-EpiSCs and in their reversion from primed ESD-EpiSCs to naïve rESCs and 2) reactive species inhibit naïve mESC differentiation to mesoderm and endoderm but promote ectodermal differentiation by enhancement of FGF4 signaling and inhibition of Wnt signaling.

Keywords: ES cells, Naïve state, Primed state, *O*-GlcNAc, reactive species, Wnt signal, FGF4 signal

### 1.緒言

ES 細胞と iPS 細胞は、未分化状態を維持しつつ、自己複製でき、かつ、身体を構成する全ての組織の細胞に分化できる能力を有している多能性幹細胞である。マウス ES 細胞 (mESCs) は、着床前の胚の内部細胞塊から樹立された“ナイーブ状態”の多能性幹細胞である。一方、マウスエピブラスト幹細胞 (EpiSCs) は着床後の胚のエピブラストから樹立された“プライム状態”の多能性幹細胞である。ヒト ES 細胞 (hESCs) は遺伝子発現解析などから EpiSCs に類似しており、プライム状態であるとされている。ナイーブ状態の mESCs は、培地に leukemia inhibitory factor (LIF) を添加することで未分化性を維持する。LIF の代わりに、fibroblast growth factor 2 (FGF2) を添加し、培養し続けると、mESCs は、プライム状態の ESC-derived EpiSCs (ESD-EpiSCs) に分化する。また、プライム状態の ESD-EpiSCs は、ナイーブ状態の mESC に戻ることができる。そのため、ESD-EpiSCs は、プライム状態の維持機構の解明や、プライム状態からナイーブ状態への遷移におけるメカニズムの解明のための研究に用いられている。

多能性幹細胞の未分化・分化は、様々なシグナルによって制御されている。ナイーブ状態の mESCs を維持するときに LIF を添加する理由は、LIF シグナルが、その下流でナイーブ状態の未分化性維持に関わる遺伝子の転写を促進しているからである。LIF シグナル以外にも、Wnt, bone morphogenetic

protein 4 (BMP4) シグナルがナイーブ状態の維持に必須である。ナイーブ状態の mESCs からプライム状態の ESD-EpiSCs への誘導・維持に FGF2 を用いるのは、FGF2 シグナルが、ナイーブ状態の mESCs からプライム状態への分化を促進し、かつ、プライム状態の維持に必須であるからである。これらのシグナルが活性化するためには、細胞質内に存在する個々のシグナル構成因子が活性化することが必須である。細胞質内シグナル構成因子の活性化・不活性化はリン酸化、ユビキチン化や糖鎖修飾などの翻訳後修飾により制御されている。すなわち、翻訳後修飾は、シグナルを制御して多能性幹細胞の未分化・分化を決定している要因の一つである。

*O*-GlcNAc (*O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン) は、核・細胞質内に存在する種々のタンパク質のセリン、スレオニン残基に、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が 1 分子結合した糖鎖修飾である。*O*-GlcNAc 転移酵素 (Ogt) は、タンパク質のセリン、スレオニン残基に、UDP-GlcNAc から GlcNAc を転移する。一方、*O*-GlcNAc は *O*-GlcNAc 分解酵素 (Oga) により分解される。Ogt には、nucleocytoplasmic Ogt (ncOgt)、mitochondrial Ogt (mOgt)、short Ogt (sOgt) の 3 つのアイソフォームがあり、ncOgt と sOgt は核と細胞質に局在し、mOgt はミトコンドリアに局在する。一方、Oga には long-Oga (L-Oga) と short-Oga (S-Oga) の 2 つのアイソフォームがあり、どちらも核と細胞質に局在する。*O*-GlcNAc は、タンパク質のリン酸化の

抑制、安定化、局在、または転写因子の転写活性などを制御していることが報告されている[1]。mESCs、または、hESCs における *O*-GlcNAc の機能についてはいくつかの報告がある[2,3]。しかし、プライム状態の ESD-EpiSCs、または、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態への移行における *O*-GlcNAc の機能については不明であった。そこで、本研究では、「プライム状態の ESD-EpiSCs における *O*-GlcNAc の機能と、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態の mESCs へ戻す際の *O*-GlcNAc の機能の解明」を第一の目的とした。

一方、細胞質内の翻訳後修飾以外にも、培地中の活性酸素や、活性窒素などの活性種による酸化ストレスが、シグナルを制御し、未分化・分化を調節していることが報告されている[4]。様々な組織幹細胞で、 $H_2O_2$  などの活性酸素が幹細胞の老化を調節していることも報告されている[5]。本研究では、培地への  $H_2O_2$  の添加、または、培地中に様々な活性種を産生できるプラズマ照射装置を用い、培地中に活性種を生成させ、培地中の活性種がナイーブ状態の mESCs の分化にあたる影響を解析し、「ナイーブ状態の mESCs の分化に対する培地中の活性種の効果」を明らかにすることを第二の目的とした。本研究では、上記の多能性幹細胞の未分化・分化を制御するシグナルを調節する因子の解析を行い、それらの新規機能を見出した。

## 2.方法と結果

### 2-1. プライム状態からナイーブ状態への移行における *O*-GlcNAc の機能の解明

#### 2-1-1. ナイーブ状態からプライム状態への移行で、細胞質内の *L*-Oga と *S*-Oga が増加する

ナイーブ状態の mESCs は、LIF を添加せずに、代わりに 15ng/ml FGF2 と、0.6  $\mu$ M JAK 阻害剤(LIF シグナル阻害剤)を加え培養するとプライム状態の ESD-EpiSCs に分化する。JAK 阻害剤は ESD-EpiSCs への分化を促進することが知られている。ESD-EpiSCs は、ナイーブ状態の mESCs に比べて扁平なコロニーであり(図1A)、プライム状態マーカーである *Fgf5* の発現が高く、ナイーブ状態マーカーである *Klf4* の発現が低い(図1B)。ナイーブ・プライム状態において *Oct3/4* は共通の未分化性維持に必須な転写因子であるため、両状態で発現量に変化は無い。リン酸化 Erk1/2 は、Erk1/2 の活性化状態を意味しており、ナイーブ状態において分化を促進するが、プライム状態では未分化性の維持に寄与している。誘導した ESD-EpiSCs におけるリン酸化 Erk1/2 の発現量は mESCs と比べて顕著に高かった(図1C)。以上の事実より、誘導した ESD-EpiSCs はプライム状態の多能性幹細胞であることが明らかになった。

次に、ナイーブ状態の mESCs とプライム状態の ESD-EpiSCs における Ogt, Oga, *O*-GlcNAc の発現を検討した。本研究では ncOgt を特異的に認識する抗 Ogt 抗体(H-300)と、2つのアイソフォーム(*L*-Oga と *S*-Oga)を認識する抗 Oga 抗体(SAB4200267)を用いた。解析の結果、ncOgt の発現は mESCs とプライム状態の ESD-EpiSCs では、変化がなかった(図2A)。プライム状態の ESD-EpiSCs における、*L*-Oga と *S*-Oga の発現は、mESCs と比較して、顕著に増加した。さらに、*O*-GlcNAc 修飾のパターンも両状態で異なることが明らかになった(図2B)。

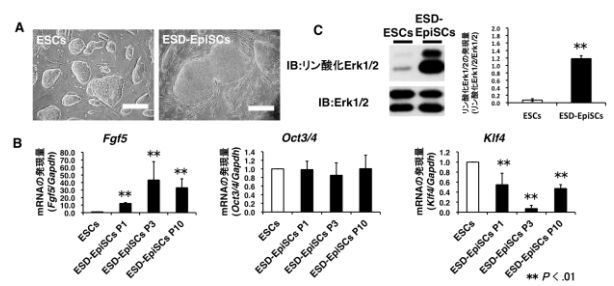


図1: ナイーブ状態の mESC からプライム状態の ESD-EpiSCs への誘導

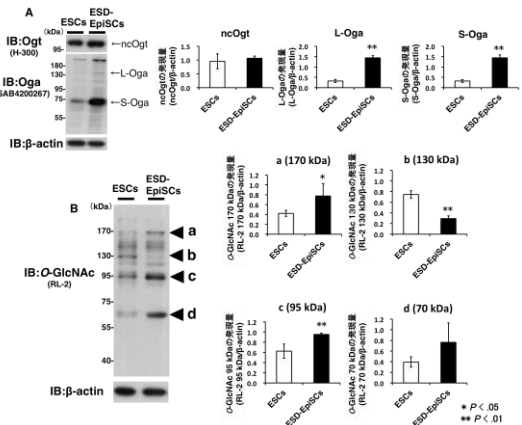


図2: ESD-EpiSCs における Ogt, Oga, *O*-GlcNAc の発現の検討

プライム状態の ESD-EpiSCs における Ogt, Oga, *O*-GlcNAc の局在を検討するため、核画分と細胞質画分を分離し、解析を行った。解析の結果、プライム状態の ESD-EpiSCs において、ncOgt は核と細胞質に局在しており、*L*-Oga と *S*-Oga の両者は細胞質のみに局在していた(図3A)。抗 Ogt 抗体(H-300)と抗 Oga 抗体(SAB4200267)を用いた免疫染色の結果から、ESD-EpiSCs において、ncOgt は核と細胞質に局在しており、2つの Oga アイソフォームは細胞質のみに局在していることがさらに確認された(図3B)。核・細胞質画分における *O*-GlcNAc 修飾のパターンは異なっており、ナイーブ状態からプライム状態への移行に伴って減少した 130kDa のバンド(図2B バンド b)は、細胞質に局在するタンパクであることが分かった(図3C)。以上の事実より、ナイーブ状態の mESCs からプライム状態の ESD-EpiSCs に移行する際、細胞質の *L*-Oga と *S*-Oga が増加し、*O*-GlcNAc 修飾のパターンが変化することが明らかになった。

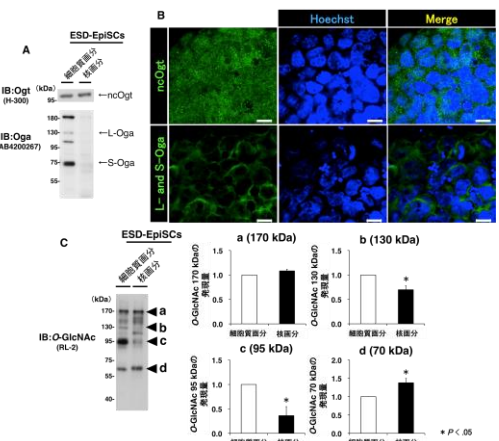


図3: ESD-EpiSCs における Ogt, Oga, *O*-GlcNAc の局在の検討

## 2-1-2. プライム状態において Ogt は生存に必須である

プライム状態の ESD-EpiSCs における Oga と Ogt の機能について検討するため、PUGNAc (Oga 阻害剤: Ogai) と、Phenyl 5-chloro-2-oxo-3-hydrobenzoxazole-3-carboxylate (Ogt 阻害剤: Ogti) を用いた。ESD-EpiSCs に 200  $\mu$ M Ogai を加えると、O-GlcNAc が分解されず、O-GlcNAc が増加したが、コントロールと比較して、コロニーの形や数には変化がなかった (図4 A, B)。また、リアルタイム PCR 解析の結果、ナイーブ状態・プライム状態の各マーカー遺伝子の発現にも変化がなかった (図4C)。以上の事実より、プライム状態の ESD-EpiSCs において、Oga は生存や未分化性の維持には関与しないことが明らかになった。

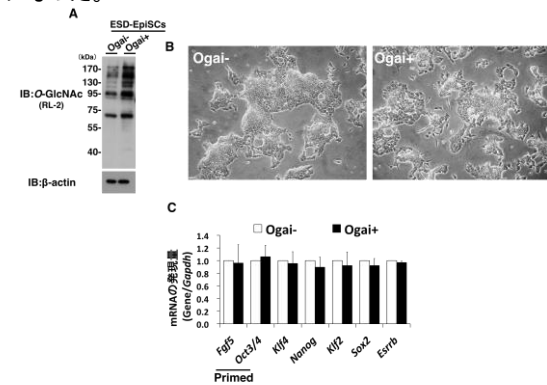


図4: ESD-EpiSCs における Oga の機能の検討

プライム状態の ESD-EpiSCs に 140  $\mu$ M Ogti を加えると、O-GlcNAc が減少した (図5A, C)。この時、未分化性は変化しなかったが、死細胞の数が有意に増加した (図5A, B, D)。以上の事実より、プライム状態の ESD-EpiSCs において Ogt は生存に必須であることが明らかになった。

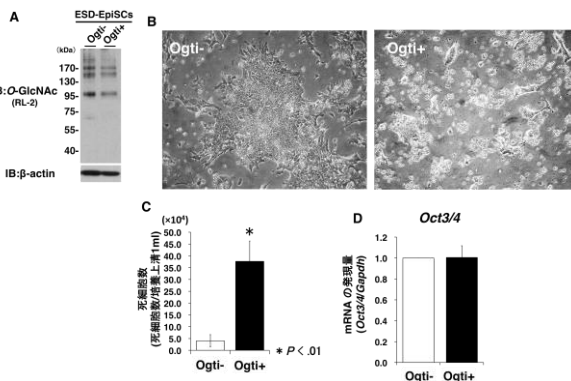


図5: ESD-EpiSCs における Ogt の機能の検討

## 2-1-3. プライム状態からナイーブ状態への移行には Ogt と Oga の両者が必須である

プライム状態の ESD-EpiSCs を、FGF2 と JAK 阻害剤を加えずに、LIF、1  $\mu$ M PD0325901 (FGF シグナル阻害剤)、3  $\mu$ M CHIR99021 (Wnt シグナル促進剤) を加え、1 週間、フィーダー細胞上で培養すると、ナイーブ状態の mESCs 様の細胞 (reverted ESCs: rESCs) に戻ることができる。ナイーブ状態の mESCs はアルカリフォスファターゼ活性を有しており、アルカリフォスファターゼ染色を行うと青紫色に染まる。一方、プライム状態の ESD-EpiSCs はアルカリフォスファターゼ活性が無いため、アルカリフォスファターゼ染色では染まらない。このため、rESCs におけるアルカリフォスファターゼ染色陽性のコロニーを数えるとナイーブ化効率を算出することができる。

ナイーブ状態の mESCs からプライム状態の ESD-EpiSCs に移行する際に Oga の発現が顕著に増加したため (図2A)、ESD-EpiSCs から rESCs 誘導時に Ogai を加えることでナイーブ化効率が増加すると予想した。しかし、予想に反して、Ogai を加えると有意にナイーブ化効率が減少した (図6)。さらに、ESD-EpiSCs から rESCs 誘導時に Ogti を加えると、Ogai 添加時より、有意にナイーブ化効率が減少した。以上の事実より、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態の rESCs への移行には、Ogt と Oga の両者が必須であることが明らかとなった。

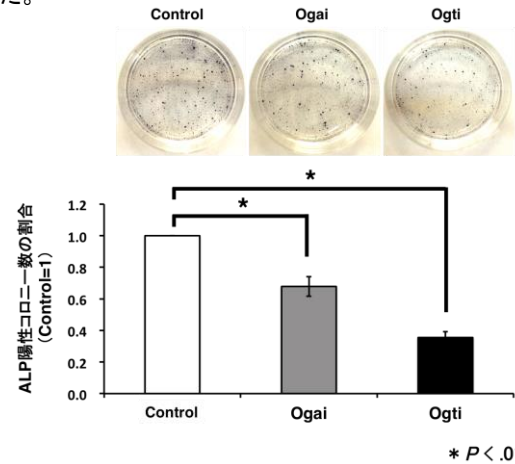


図6: プライム状態からナイーブ状態への移行における Ogt, Oga の機能の検討

## 2-2. 培地中の活性種がナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化にあたる影響の解析

培地中の活性酸素種がナイーブ状態の mESCs の分化に与える影響を検討するため、 $H_2O_2$  を添加した培地を用いた。また、プラズマ照射は、培地中に  $H_2O_2$  を含めた様々な活性種を産生するので、本研究では、プラズマ照射培地を作成し、これも実験に用いた。プラズマ装置は大阪大学の浜口先生から貸与していただいた。

プラズマ照射により産生される培地中の活性種は、ナイーブ状態の mESCs の増殖を抑制するが、未分化性維持には影響を与えないことがわかった。胚様体 (EB) 形成は *in vivo* の胚発生を模倣しており、三胚葉への分化を *in vitro* で検討することができる。本研究では、 $H_2O_2$  添加培地、プラズマ照射培地中で EB 形成させ、シグナルとの関連も含めた詳細な解析を行った。

エピブラストマーカー *Fgf5* の発現は、 $H_2O_2$  添加培地とプラズマ照射培地でともに増加傾向にあることが分かった (図7A)。次に、 $H_2O_2$  添加培地とプラズマ照射培地が、エピブラストへの分化を促進させる FGF4 シグナルを促進させているか検討した。Erk1/2 は FGF4 シグナルの下流で活性化され (リン酸化され)、リン酸化 Erk1/2 は mESCs からエピブラストへの分化を促進させる。リン酸化 Erk1/2 の発現量は、プラズマ照射培地と  $H_2O_2$  添加培地で有意に増加していた (図7B)。また、FGF4 シグナルの標的遺伝子 (*Spry2*)、シグナル構成因子 (*Fgf4*) の発現量が増加していた (図7C, D)。以上の事実より、培地中の  $H_2O_2$  は FGF4 シグナルを活性化させ、エピブラストへの分化を促進していることが明らかになった。

さらに、中胚葉マーカー *T* と内胚葉マーカー *Foxa2* の発現を解析したところ、 $H_2O_2$  添加培地は中胚葉への分化を促進させ、内胚葉への分化には影響しなかった (図7E, F)。しかし、プラズマ照射培地ではどちらも有意に抑制されていた。また、中胚葉・内胚葉の分化の促進に寄与する Wnt シグナルの構



成因子 (*Fzd1*, *Fzd5*) の発現解析を行ったが、 $H_2O_2$  添加培地では Wnt シグナル受容体の発現に変化なかった (図7G, H)。一方、プラズマ照射培地が Wnt シグナル受容体の発現を抑制していることが明らかになった。以上の事実より、プラズマ照射によって生成された  $H_2O_2$  以外の活性種により Wnt シグナルが抑制され、中胚葉・内胚葉の分化を抑制していることが明らかとなった。

外胚葉マーカーである *Pax6* の発現を解析したところ、 $H_2O_2$  添加培地とプラズマ照射培地で有意に増加していた (図7I)。さらに、 $H_2O_2$  添加培地とプラズマ照射培地が、外胚葉への分化を促進させる FGF4 シグナルを促進させていることも明らかになった (図7J)。以上の事実より、培地中の  $H_2O_2$  は、FGF4 シグナルを活性化させ、外胚葉への分化を促進していることが明らかになった。

さらに、神経細胞とグリア細胞のマーカーの発現を検討した。 $H_2O_2$  添加培地とプラズマ照射培地で、神経細胞マーカーである *Tubb3* のみが有意に増加していたが、グリア細胞マーカー (*GFAP* と *Olig1*) は変化しなかった (図7K)。以上の事実より、培地中の  $H_2O_2$  は、神経細胞への分化を促進するが、グリア細胞への分化には関与しないことが明らかになった。

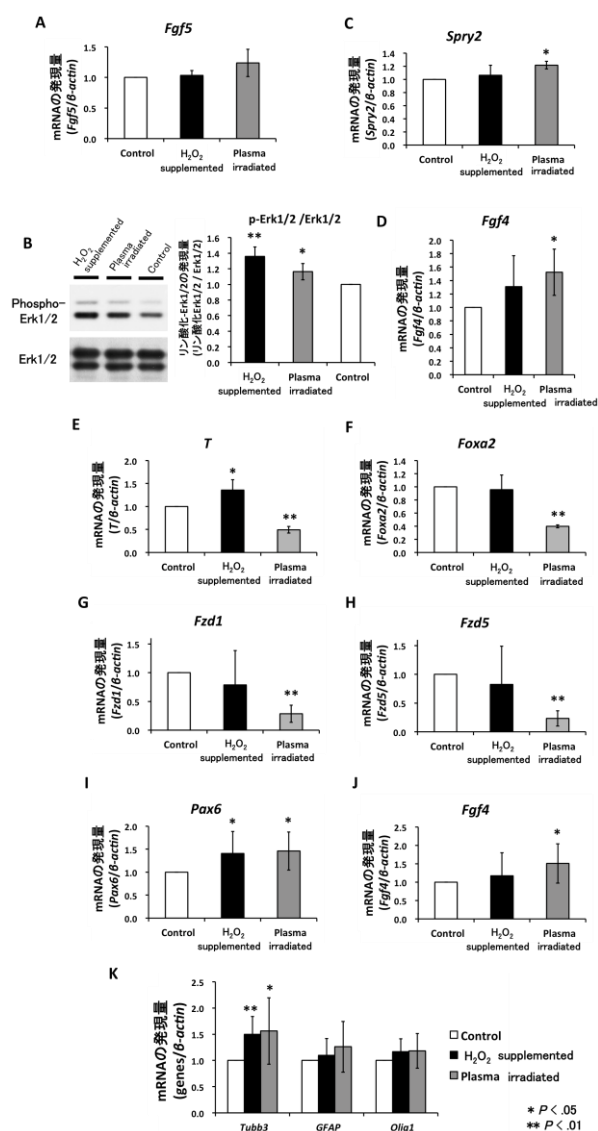


図7: プラズマ照射と  $H_2O_2$  の分化への影響の解析

### 3. 考察と結論

本研究により、以下の2つを明らかにした。

#### 3-1. O-GlcNAc 修飾はプライム状態の ESD-EpiSCs の生存に必須であり、プライム状態からナイーブ状態への移行に必須である (図8)

ナイーブ状態からプライム状態への移行において、細胞質内の Oga の2つのアイソフォームの発現が顕著に増加した。プライム状態において Ogt は生存に必須であるが未分化性には関与しなかった。ナイーブ状態からプライム状態への移行に Ogt は必須であるが、Oga は関与しないことが報告されている[6]。本研究は、プライム状態からナイーブ状態への移行には Ogt と Oga の両者が必須であることを明らかにした。これらの結果は、ナイーブ状態とプライム状態の維持・遷移において O-GlcNAc が重要な役割を担っていることを示していた。本研究の成果は、ナイーブ状態のヒト ES 細胞の樹立、また、様々な哺乳類の ES 細胞における O-GlcNAc 修飾を受けるタンパク質を同定することで、なぜマウスの ES 細胞のみがナイーブ状態なのかという問題の解決につながることを期待される。

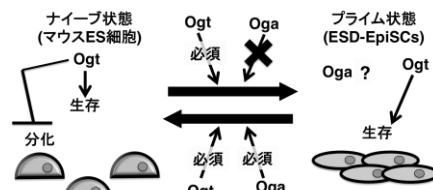


図8: ナイーブ状態とプライム状態の遷移における O-GlcNAc の機能

#### 3-2. 培地中の活性種の三胚葉分化への影響 (図9)

培地中の  $H_2O_2$  が FGF4 シグナルを活性化し、エピプラスト、外胚葉、神経への分化を促進することを明らかにした。さらに、プラズマ照射により生成された  $H_2O_2$  以外の活性種が、Wnt シグナルを抑制し、内胚葉と中胚葉への分化を抑制することも明らかにした。これらの結果は、プラズマ照射の mESCs の分化に対する効果の初めての例である。また、組織幹細胞の老化においても、活性酸素が同様のシグナルを制御している可能性も示唆された。

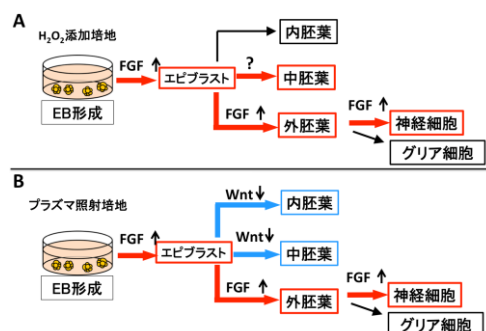


図9: 活性種によるマウス ES 細胞の三胚葉分化への影響

### 4. 参考文献

- AK. Nagel, LE. Ball. *Amino Acids*. 10 (2014) 2305–2316.
- H. Jang, T.W. Kim, S. Yoon, *et al.*, *Cell Stem Cell* 11 (2012) 62–74.
- J.J. Maury, K.K. Chan, L. Zheng, *et al.*, *Stem Cell Res.* 11 (2013) 926–937.
- F. Ren, K. Wang, T. Zhang, *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1850 (2015) 1518–1526.
- J. Oh, YD. Lee, AJ. Wagers, *et al.*, *Nat Med*. 8 (2014) 870–880.
- CM. Speakman, TC. Domke, W. Wongpaiboonwattana *et al.* *Stem Cells*. 32 (2014) 2605–2615.